R. UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

186

O. VERONA E I. DE MARCHI

COMPORTAMENTO DI "PHOMA BETAE FRANK" DI FRONTE AL BORO

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME II - (XL DALLA FONDAZIONE)
1939- XVII

PISA, PREMIATO STABILIMENTO TIPOGRAFICO G. CURSI & FIGLI - 1939 XVII

O. VERONA E I. DE MARCHI

COMPORTAMENTO DI "PHOMA BETAE FRANK" DI FRONTE AL BORO

RIASSUNTO – Sperimentata l'azione dell'acido borico e del tetraborato sodico sullo sviluppo di *Phoma betae*, è stato osservato che, in relazione alla costituzione del mezzo, l'acido borico esercita, in piccole quantità, azione di stimolo. In quantità relativamente forti, acido borico e tetraborato sodico — quest'ultimo più del primo — ostacolano od inibiscono lo sviluppo del fungo. Altresì è stata sperimentata l'azione del pH. Al riguardo è stato trovato come *Phoma betae* sviluppa bene in mezzi relativamente acidi ma non viene sensibilmente danneggiato da mezzi fortemente alcalini.

Infine è stato segnalato un caso di antagonismo tra il fungo e il *Bac. subtilis*.

RÉSUMÉ – On expérimenta l'action de l'acide borique et celle du tetraborate sodique sur le développement de *Phoma betae*, et on constata que, en rapport avec la constitution du milieu, l'acide boríque, en petites quantités, exerce une action stimulante. En quantités relativement élevées l'acide borique et plus encore le tétraborate sodique entravent ou inhibent le développement du champignon. En outre on a expérimenté l'action du pH. A ce propos on a constaté que *Phoma betae* pousse bien dans des milieux relativement acides mais que les milieux fortement alcalins ne nuisent pas sensiblement à son développement.

Enfin on a signalé un cas d'antagonisme entre le champignon et le *Bac. subtilis*.

ZUSAMMENFASSUNG – Nachdem die Wirkung der Borsäure und des Natriumtetraborate auf die Entwicklung von *Phoma betae* experimentell untersucht worden war, ist beobachtet worden, dass je nach der Beschaffenheit des Mittels die Borsäure in kleinen Mengen eine stimulierende Wirkung ausübt. In relativ starken Mengen hemmen oder verhindern Borsäure und Natriumtetraborat — letzteres mehr als die erstere — die Entwicklung des Pilzes. Ebenso ist die Wirkung von pH untersucht worden. Dabei hat man gefunden, dass *Phoma*

betae gut wächst in verhältnismässig säuren Mitteln dass es aber in seiner Entwicklung von stark alkalischen Mitteln nicht merkbar geschädigt wird.

Schliesslich ist ein Fall Antagonismus zwischen dem Pilz und dem *Bac. subtilis* festgestellt worden.

SUMMARY – Experiments on the action of a boric acid and tetraborate of soda in the growth of the *Phoma betae*, led to the observation that, with regard to the nature of the agents, boric acid in small doses, acts as a stimulant. Whereas, in comparatively larger doses, boric acid and tetra-borate of soda – the latter more than the former - hinder and even prevent the growth of the fungus.

The action of ph, also tried by esperiments, proves how *Phoma betae* thrives in comparatively acid agents, but is not actually damaged in its growth by strongly alkaline agents.

A case of antagonism between the fungus and the *Bac. subtilis* has been verified.

Sulla esatta eziologia del così detto "mal del cuore„ della Bietola poco di certo sappiamo, nonostante il comparire di sempre nuovi studi ed osservazioni al riguardo (1).

Attribuito da prima al parassitismo di *Sphaerella tabifica* Prill. et Del. nella sua forma picnidica di *Phoma betae* Frank (=*Phyllosticta tabifica* Prill. et Del.) in seguito constatandosi che si presentava sopratutto nei terreni neutri od alcalini, esso si volle relazionare all'esponente alcalimetrico del suolo. Di recente, BRANDENBURG, ha creduto di poter connettere la malattia ad una deficienza in boro del terreno, escludendo il parassitismo del *Phoma* e attribuendo alla sua presenza valore accidentale, ed altresì escludendo l'influenza degli ioni OH capaci solo di determinare la immobilizzazione del boro.

(1) – R. PEROTTI. — *Biologia Vegetale applicata all'Agricoltura*: III, Malattie parassitarie, Ed. Rosenberg, Torino, 1940.

(2) – O. VERONA. — *L'alimentazione minerale delle piante in rapporto al loro stato di sanità*, Ed. Tornar, Pisa 1938.

Relazionando gli accertamenti di BRANDENBURG con quelli di altri sperimentatori è possibile di concludere:

— la malattia, in campo, si verifica solo o prevalentemente nei suoli B-carenti;
— la medesima può prevenirsi o curarsi per aggiunte di boro al terreno;
— la malattia è, sperimentalmente, riproducibile in piante sviluppate in mezzo liquido, qualora questo sia privo di boro, all' infuori dell'intervento del *Phoma* e nelle medesime arrestata a seguito di somministrazioni dell'elemento;
— nelle piante ammalate raccolte in campo si rinviene, bene spesso, il *Phoma*;
— inoculazioni artificiali, infine, del fungo riproducono in piante sane la malattia.

Tali accertamenti suggeriscono l' idea che il "mal del cuore„ non costituisca una malattia ben definita, ma piuttosto rappresenti un sintomo o, meglio, l'effetto di due diverse malattie: una, parassitaria, dovuta a *Phoma betae*; l' altra, nutizionale, dovuta a carenza di boro.

Altrimenti si potrebbe anche ammettere — ma ciò trova poco appoggio nei reperti sperimentali — che in mezzo provvisto di boro le piante assumano una particolare resistenza agli attacchi del parassita.

Comunque, nella pur vasta sperimentazione che si è avuta sull'argomento, non ci risulta che esista una qualche ricerca diretta a stabilire il comportamento del fungo di fronte al boro e che pertanto possa illuminarci sopra le questioni prospettate.

È per tale motivo che abbiamo voluto eseguire qualche esperienza al riguardo ricercando, in particolare, l' influenza esercitata dal boro sullo sviluppo di *Phoma betae* ed altresì di stabilire il pH ottimo dello sviluppo stesso.

Per tali ricerche, appresso descritte, ci siamo valsi di un ceppo di *Phoma betae* inviatoci dal C. B. S. di Baarn.

COMPORTAMENTO DI *Phoma betae* DI FRONTE A DOSI PROGRESSIVAMENTE CRESCENTI DI BORO.

Una prima esperienza è stata eseguita facendo uso di mezzi agarizzati e, precisamente, di agar-fagiuoli saccarosato al 2% addizionato o meno, di boro sotto forma sia di acido borico che di tetraborato sodico. L'agar è stato disposto in piastre. Seminato al centro della piastra e coltivato a 25° C, è stato seguito lo sviluppo del fungo mediante periodiche misurazioni del diametro delle colonie. È risultato:

Concentrazione in boro ‰	conc. corrispondente in acido borico o tetraborato sodico ‰		diametro delle colonie in mm. dopo giorni: 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
—		—	12	16	21	28	37	49	55	58	63	67	70
0,10	acido borico	0,563	12	17	21	27	35	45	50	52	57	60	62
0,25	acido borico	1,407	7	15	18	26	32	42	46	50	53	56	59
0,50	acido borico	2,815	6	15	16	23	27	35	40	44	47	51	52
1,00	acido borico	5,630	—	7	13	18	21	23	27	29	32	34	35
2,00	acido borico	11,260	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,50	acido borico	14,070	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,10	tetraborato sodico	0,868	11	15	23	30	38	52	59	62	67	71	73
0,25	tetraborato sodico	2,170	8	13	18	22	30	40	46	49	55	58	62
0,50	tetraborato sodico	4,340	4	11	13	17	19	21	24	28	31	32	34
1,00	tetraborato sodico	8,680	—	—	2	4	5	6	6	7	8	8	9
2,00	tetraborato sodico	17,360	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,50	tetraborato sodico	21,700	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Dai su riportati dati scorgesi come *Phoma betae* risulti ostacolato, nel suo sviluppo, dalla presenza di boro sia sotto forma di acido

borico che di tetraborato sodico a partire da quantità superiori allo 0,1 ‰ in elemento. Soltanto il sale sodico, in questa quantità, si è dimostrato leggermente stimolante. Il fatto appare espressivo nella fig. 2 ove è riportata la fotografia di una colonia di *Phoma betae*, al 20° giorno, sviluppata in mezzo contenente lo 0,1 ‰ in boro di tetraborato sodico rispetto ad altra colonia sviluppata in presenza dello 0,5 ‰ dello stesso sale ed in confronto con il limite raggiunto dalla colonia di controllo.

In ogni caso quantità di composti contenenti l' 1 ‰ in elemento hanno fortemente ostacolato lo sviluppo del fungo, mentre quantità pari al 2 ‰ non hanno affatto consentita la crescita.

Nel complesso, infine, il tetraborato sodico si è dimostrato più tossico, a parità di contenuto in elemento, dell' acido borico.

Una seconda esperienza è stata eseguita su mezzo liquido facendo uso del substrato seguente:

saccarosio	20,00
nitrato potassico	4,00
fosfato monopotassico	1,00
solfato di magnesio	0,30
cloruro sodico	0,10
cloruro di ferro	0,01
acqua	1000,00

Distribuito in ragione di cc. 50 in beutine da 100 cc. e addizionato o meno dei composti in esperimento, in esso fu seminato *Phoma betae* che si coltivò in termostato a 20° C. per 20 giorni.

Al ventesimo giorno furono raccolte le membrane, essiccate a 110° C. e pesate ottenendosi:

		Peso delle membrane, gr.:
controllo:		0,218
acido borico	0,10 ‰ in B	0,256
	0,25 „ „	0,234
	0,50 „ „	0,215
	1,00 „ „	0,141
	2,00 „ „	—
tetrab. sodico	0,10 ‰ in B	0,190
	0,25 „ „	0,110
	0,50 „ „	0,075
	1,00 „ „	—
	2,00 „ „	—

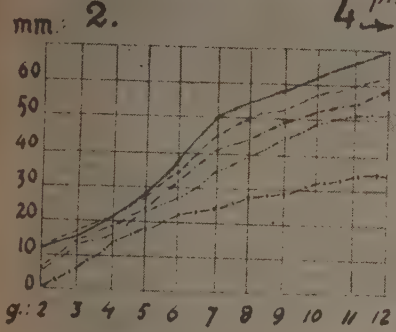
I resultati appaiono, ad un dipresso, comparabili ai precedenti. È confermata la leggera azione di stimolo da parte di piccole quantità di acido borico; l'azione inibente di quantità pari all' 1-2 ‰ in elemento; la maggiore tossicità presentata dal tetraborato sodico rispetto all' acido borico.

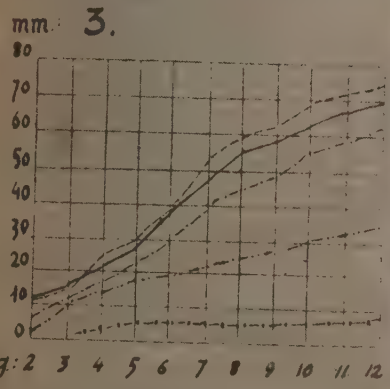
CONCENTRAZIONE IDROGENIONICA DEL MEZZO E SVILUPPO DI *Phoma betae.*

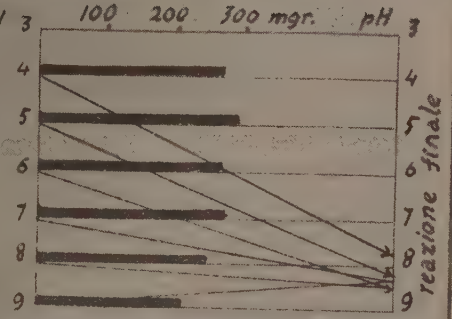
Per le seguenti prove abbiamo usato il substrato liquido anzi scritto portato al pH voluto per addizione di alcali potassico od acido cloridrico e distribuito in uguali quantità in beutine da 100 cc. Le colture si protrassero per 24 giorni, coltivando a 25° C. Al 24° giorno furono pesate le membrane previamente essiccate a 110° C. e determinato il pH del mezzo. Risultò:

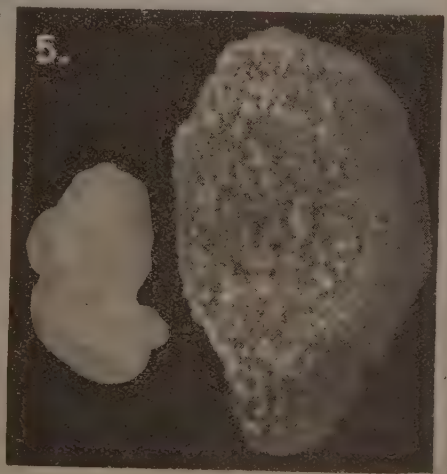
pH iniziale	Peso delle membrane gr.:	pH finale
3	(nessuno sviluppo)	3
4	0,270	7,8
5	0,287	8,1
6	0,269	8,5
7	0,270	8,4
8	0,241	8,5
9	0,215	8,4

1.


mm.
2.
60
50
40
30
20
10
0
g: 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12


mm.
3.
80
70
60
50
40
30
20
10
0
g: 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12


4
pH
3
4
5
6
7
8
9
100 200 300 mgr.
pH
reazione finale


5.

Il maggiore sviluppo fu registrato adunque in mezzo a pH 5. È da notare però che lo sviluppo osservato nei mezzi a pH 4, 6, 7, non fu sensibilmente diverso. Solo in mezzo fortemente acido (pH 3) *Phoma betae* non si dimostrò capace di sviluppare; e solo in mezzi decisamente alcalini (pH 8-9) lo sviluppo fu, rispetto a quello di pH 5, leggermente inferiore.

In quanto al pH finale, esso si è aggirato su pH 8.

Azione antagonista di *Bac. subtilis* su *Phoma betae*.

Prima di chiudere, vogliamo segnalare un caso di antagonismo osservato su di una piastra all'acido borico (0.25 ‰ in elemento) tra *Phoma betae* ed una colonia batterica inquinante (fig. 4).

Il batterio, isolato, fu possibile di riferirlo, per l'insieme dei suoi caratteri, al gruppo di *Bac. subtilis*.

In armonia a quanto è noto sul meccanismo di azione dell'antagonismo microbico pensammo di attribuire il fatto all'azione ostacolante dei prodotti metabolici del bacillo.

Per maggiore certezza allestimmo una coltura del bacillo in brodo di carne. Dopo 15 giorni di coltura il liquido fu filtrato per candela e addizionato in quantità progressivamente crescenti ad agar al brodo di carne. Con tale agar furono allestite piastre di sviluppo per *Phoma betae* che coltivammo, come al solito, a 25° C.

Al 10° giorno di sviluppo furono misurate le colonie del fungo, risultando:

	Diametro delle colonie in mm.
Controllo	68
filtrato 1 ‰	62
„ 5 „	40
„ 10 „	35
„ 20 „	28
„ 30 „	15
„ 40 „	6
„ 50 „	—

Manifestamente, i liquidi reflui del metabolismo batterico ostacolano, più o meno, a seconda delle quantità presenti, lo sviluppo di *Phoma betae*.

Conclusioni

È stata sperimentata l'azione dell'acido borico e del tetraborato sodico sullo sviluppo di *Phoma betae*. Si è osservato che, in relazione alla costituzione del mezzo, l'acido borico esercita, in piccole quantità (0,1-0,2‰ in elemento), azione di stimolo. Per più forti quantità, acido borico e tetraborato sodico — quest' ultimo più del primo — ostacolano od inibiscono lo sviluppo del fungo.

La sensibilità di *Phoma betae* rispetto al boro, appare tuttavia non eccezionale, paragonabile per quanto ci è noto a quella presentata da altri funghi patogeni o da altri germi e non tale da far pensare che il boro eserciti un'azione preventiva sul manifestarsi del suo parassitismo. Potrebbe solo, se del caso — ma ciò resta a dimostrarsi — modificarsi il suo stato di virulenza.

Altresì è stata sperimentata l'azione del pH trovandosi al riguardo che *Phoma betae* sviluppa bene in mezzi relativamente acidi ma che non viene sensibilmente danneggiato da mezzi fortemente alcalini. In ogni caso il pH finale si osservò aggirarsi intorno a pH 8.

È stato segnalato un caso di antagonismo tra fungo e *Bac. subtilis*.

Pisa, Facoltà di Agraria della R. Università
Istituto di Patologia Vegetale
e Microbiologia Agraria e Tecnica

(Presentata il 12 Ottobre 1939 - XVII)

Spiegazione della Tavola

Fig. 1 — Sviluppo comparativo di *Phoma betae* in mezzi contenenti, o non, boro

Fig. 2 — Sviluppo di *Phoma betae* in mezzi agarizzati contenenti, o non, boro sotto forma di acido borico

——— controllo _ _ _ _ _ ac. borico 0,1 ‰ in B
_ . _ . _ . id. 0,25‰ „
_ . . _ . . _ id. 0,50 „ „
_ | _ | _ | id. 1,— „ „

Fig. 3 — Sviluppo di *Phoma betae* in mezzi agarizzati contenenti, o non, boro sotto forma di tetraborato sodico

——— controllo _ _ _ _ _ ac. borico 0,1‰ in B
_ . _ . _ . id. 0,25‰ „
_ . . _ . . _ id. 0,50 „ „
_ | _ | _ | id. 1,— „ „

Fig. 4 — Influenza del pH sullo sviluppo di *Phoma betae* e pH finale.

Fig. 5 — Antagonismo tra *Phoma betae* e *Bac. subtilis*.